

バチルス・ポピリエの胞子嚢の製造方法、防除剤及び防除方法

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. FIELD OF THE INVENTION

5 本発明は、コガネムシ科昆虫の防除剤として有用な胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢（以下、「胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢」を単に「胞子嚢」ということがある）の製造方法に関する。

10 2. DESCRIPTION OF RELATED ART

コガネムシ科昆虫の幼虫は、芝や農園芸作物や樹木等の広範囲な植物の根を食餌し、多大な被害を与えることが知られている。該幼虫は、地中に棲息するため、幼虫の存在位置も特定し難いうえ、地上から化学農薬を散布しても高い防除効果が得られない。そこで、著効を示すには広範囲に、しかも多量の農薬散布を行ない、地中に農薬を浸透させる必要があった。しかしながら、この方法は自然環境や人体に対する悪影響が懸念されており、より有効な防除方法が切望されていた。

20 バチルス・ポピリエに属する菌は、コガネムシ科昆虫の幼虫に寄生して乳化病を発病させ、最終的にこれらを死に至らしめることが知られており、化学農薬が効きにくいコガネムシ科昆虫の防除に該菌の胞子嚢を利用しようとする試みは古くから行われてきた。しかしながら、該菌はコガネムシ科昆虫の幼虫体内では生育するものの、人工培地を用いた培養で生育させることは難しく、該菌の胞子嚢を培地で製造することは特に難しかった。また、福原は、従来の培地を用いた培養で得た胞子嚢では幼虫の感染、発病が起こらないと報告している（福原俊彦著昆虫病理学57頁、1979年）。即ち、防除剤として有効な該胞子嚢の効率的大量生産方法はこれまで存在しなかった。

25 例えは、ハイネスらはペプトン0.5%、酵母エキス1.5%、リン酸水素二カリウム0.3%、グルコース0.1%及び活性炭1%を含む液体培地でバチルス・ポピリエに属する菌の培養を試み、最大で培養液1m1当たり2.06×1

0'個の胞子嚢が得られた例を報告している (Journal of Invertebrate pathology, 22巻, 377~381頁, 1973年)。しかし、培地に対するグルタミン酸の含有量や全アミノ酸に対するグルタミン酸の割合は不明であり、また、ハイネスらは、同じ報告において、アミノ酸組成は、胞子嚢の生産には関係ないと記載している (379頁、第1コラム、19行目)。

また、ハイネスらは、対数増殖後期の成熟した細胞をペプトン (トリプトン) 0.5%、酵母エキス 1.5%、リン酸水素二カリウム 0.3%、グルコース 0.1%、活性炭 1% を含む液体培地成分でバチルス・ポピリエを培養することによって、培養液 1 ml 当たり 3.1×10^7 個の胞子嚢を得たと報告している (Journal of Invertebrate pathology, 19巻, 125~130頁, 1972年)。しかし、この培養方法は培養時間が長く、2週間程度かかっていた。

また、米国特許第 4824671 号明細書には、1%、可溶性デンプン、0.1% トレハロース、0.5% 酵母エキス、0.3% リン酸水素二カリウム、0.1% 炭酸カルシウムを含む液体培地で培養し、培養液 1 ml 当たり 1×10^9 個の胞子が得られた例が挙げられている。しかし、この場合も得られた胞子はパラスボラルボディを伴っておらず、土壤 1 kg に 2.0×10^{12} 個の割合で胞子を散布し、コガネムシ科昆虫の幼虫に経口摂取させた際の乳化病感染率は 7 週間で 47.50% であり、幼虫体内で形成された胞子嚢と比較してもコガネムシ科昆虫の幼虫に対する殺虫効果は弱かった。

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

本発明が解決しようとする課題は、コガネムシ科昆虫に対し防除効果を有する胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢を効率良く得る製造する方法、該製造方法により得られる前記胞子嚢を利用したコガネムシ科昆虫の防除剤及び防除方法を提供することにある。

本発明者らは上記課題を解決すべく銳意研究を重ねた結果、胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢は、グルタミン酸と、

生育阻害物質を除去すると考えられる吸着剤とを特定濃度添加した培地で培養することによって、効率良く得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は上記課題を解決するために、吸着剤を含む培地でバチルス・ポピリエに属する菌を培養して、胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢を製造する方法において、前記培地が0.2~4.0質量%のグルタミン酸を含むことを特徴とする胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢の製造方法を提供する。

また本発明は、前記製造方法により得られた胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢を有効成分として含有するコガネムシ科昆虫の防除剤及び該防除剤をコガネムシ科昆虫の生息土壤に散布するコガネムシ科昆虫の防除方法を提供する。

本発明の製造方法によれば、胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢を高収率で製造することできる。また、本発明の製造方法で得られる胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢は、昆虫、特にコガネムシ科昆虫の幼虫に対する殺虫又は生育阻害等の防除効果を示すので、これらの昆虫の防除剤及び防除方法として有用である。

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEVERAL VIEWS OF THE DRAWINGS

図1は、胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエの胞子嚢の模式図である。

図2は、アミノ酸分析に用いた高速液体クロマトグラフィーシステムの模式図である。

図3は、実施例4~8、比較例9~10における培地中のグルタミン酸濃度に対する胞子嚢数及び菌体数を示したグラフである。

図4は、生物試験例1におけるドウガネブイブイの生育阻害効果を示したグラフである。

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明で用いるバチルス・ポピリエ (*Bacillus popilliae*) に属する菌の細菌学的性質は、バージェイズ・マニュアル・オブ・データーミネイティブ・バクテリオロジー第8版 (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eighth Edition*) によれば、形態的性質は長さが 1. 3~5. 2 μm 、幅が 0. 5~0. 8 μm のグラム陰性桿菌であり、生育温度は 20~35°C で、その胞子囊は、その中に胞子とパラスボラルボディとを有する。

バチルス・ポピリエに属する菌の胞子囊 1 は、図 1 に示す模式図の如く、胞子 3 とパラスボラルボディ 2 (又は副胞子小体) と呼ばれる小体を含む囊である。

しかし、従来の培地を用いたバチルス・ポピリエの培養方法に関する文献では、胞子囊と胞子とが明確な区別なく用いられている例が多く、文献中の「胞子 (spore)」という言葉が胞子のみを意味するのか、胞子のみを含む胞子囊を意味するのか、あるいは胞子とパラスボラルボディとを含む胞子囊なのか不明確であった。本発明者らは昆虫、特にコガネムシ科昆虫の幼虫の殺虫若しくは生育阻害による防除効果を得るために、胞子とパラスボラルボディとが必要であることを明らかにした。

近年、これまでの菌株も含めバチルス・ポピリエは、パエニバチルス・ポピリエ (*Paenibacillus popilliae*) に再分類されるべきとのパターソンらの学説上の見解も示されており (Int. J. Syst. Bacteriol., 49巻, 531~540頁, 1999年) が提示されている。また、リバーら (Int. J. Syst. Bacteriol., 48巻, 395~402項, 1998年) 及びハリソンら (J. Invertebr. Pathol., 76巻, 169~175項, 2000年) は、乳化病菌として知られているバチルス・ポピリエ及びバチルス・レンチモルバスを、従来両種を区別するために用いられてきたパラスボラルボディの存在の有無、2%食塩含有培地中での生育の有無という性質だけで明確に区別することができず、DNA レベルでの分類を提案している。現段階ではその分類扱が明確になつてないため、本発明においてはバチルス・ポピリエに属する菌とはパエニバチルス・ポピリエに属する菌及びパエニバチルス・レンチモルバスに属する菌をも包含するものとする。

本発明の製造方法に用いる培地は、胞子囊の生育を阻害する物質の除去を目的とした吸着剤を含む。該吸着剤としては、例えば、活性炭、吸着樹脂、アロフォサイト又はモレキュラーシープ等が挙げられる。胞子囊の生育を阻害する物質の主たるものは、過酸化水素であると考えられるので、吸着剤は、過酸化水素分解能若しくは過酸化水素除去能を有するものが好ましく、具体的には活性炭が好ましい。

吸着剤として用いられる活性炭の形状は、粉末状、粒状又はシート状等が挙げられるが、これらの中でも、粉末状の活性炭は、菌の増殖効率及び胞子囊化率に優れているので、特に好ましい。

吸着剤として用いられる吸着樹脂は、微細物質を吸着する多孔質重合体を意味し、例えば、粒子状に成型された架橋性多孔質重合体で、粒子内部にまで達する細孔構造により水溶液中の微細物質を効率よく吸着しうる合成樹脂である。具体的には、三菱化学社製の芳香族系合成樹脂吸着剤であって、商品名「DIAION HP 20」、「DIAION HP 21」、「SEPABEADS SP 8 25」、「SEPABEADS SP 850」、「SEPABEADS SP 70」、「SEPABEADS SP 700」、同社製の置換芳香族系合成樹脂吸着剤であって、商品名「SEPABEADS SP 207」、同社製のアクリル系合成樹脂吸着剤であって、商品名「DIAION HP 2MG」などを挙げることができる。

本発明の製造方法に用いる培地中の吸着剤の濃度は、本発明の効果を達成する範囲であれば特に限定されないが、培地に対して0.05～5質量%が好ましい。培地中の吸着剤の濃度を0.05質量%以上とすることにより、菌の生育阻害物質の吸着、除去効果を十分発揮させることができ、培地中の吸着剤の濃度を5%以下とすることにより、菌の増殖に必要な栄養源の吸着を最小限に抑えることができる。前記した範囲内で優れた菌の増殖促進効果を呈する。吸着剤は殺菌前の培地に添加し、培地と共に殺菌しても良いし、殺菌後の培地に予め別途殺菌したものと添加しても良い。

本発明の製造方法に用いる培地中に含まれるグルタミン酸には、その生理学的に許容される塩も含まれる。具体的には、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン

酸カリウム、グルタミン酸アンモニウム、グルタミン酸塩酸塩等が挙げられる。これらの培地中の濃度は、グルタミン酸として0.2~4.0質量%が好ましく、菌の増殖及び胞子囊化率に優れるので、0.4~1.0質量%が特に好ましい。

5 本発明の製造方法で用いる培地には、グルタミン酸以外にも通常の微生物培養に必要とされる窒素源が添加されていることが好ましい。窒素源としては、通常、微生物の培養に用いられるペプトン、肉エキス、魚肉エキス、ラクトアルブミン水解物又は酵母エキス等の有機性窒素源が挙げられる。これら以外の窒素源として、アンモニア、硝酸及びそれらの塩等の無機窒素源が挙げられる。本発明
10 用いる窒素源の培地中の濃度は、5.0質量%以下であることが好ましく、より優れた菌の増殖促進効果を呈することから0.2~4.0質量%が好ましい。

前記有機性窒素源は、各種アミノ酸を含んでいるため、該窒素源を添加することで結果的に培地中にグルタミン酸が含まれることになる。従って、該窒素源の添加量を増やすことによってグルタミン酸の濃度も高めることができるが、その
15 方法では結果的に胞子とパラスピラルボディとを含む胞子囊を形成することはできない。これは窒素源中に含まれる生育阻害物質やその他不必要な成分濃度も同時に高まるためと推測される。そのため、培地中の全アミノ酸に対するグルタミン酸の割合は35~90質量%が好ましい。

但し、本発明において全アミノ酸とは、ペプトンや酵母エキス等の通常培地に用いられる窒素源に含まれていることが知られているアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、ヒスチジン、チロシン及びバリンからなる16種類の遊離型アミノ酸の集合を指すものとする。該16種類の遊離型アミノ酸の合計量は、ペプトンや酵母エキス等に含まれる総
25 ての遊離型アミノ酸量を概ね示すものとしてしばしば用いられるものである。

さらに、本発明の製造方法で用いる培地には、通常の微生物培養に必要とされる炭素源が添加されていて良い。炭素源としては、トレハロース、シュークロース等の糖類が挙げられる。また、廃糖蜜、デンプン分解物、チーズホエー等の農産廃棄物を用いることもできる。これらの炭素源の添加濃度は、本発明の効果を

達成する範囲であれば、特に限定されないが、菌の増殖促進効果に優れるので、培地に対して0.001～5質量%が好ましい。ただし、胞子とパラスボラルボディとを含む胞子嚢を形成させるためには、グルコースの存在は好ましくなく、培地に含まれるグルコース濃度は、培地に対して0.01質量%以下とすることが好ましい。

本発明の製造方法に用いる培地には、必要に応じて、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム等のリン酸塩又はそのナトリウム塩等の無機塩が添加されても良い。該無機塩の添加濃度は、本発明の効果を達成する範囲であれば、特に制限されないが、培地に対して1質量%以下が好ましい。

さらにピルビン酸を培地に加えることによって、菌の増殖効率と胞子嚢化率をより高めることができる。本発明で言うピルビン酸には、ピルビン酸の生理学的に許容される塩も含まれる。ピルビン酸の生理学的に許容される塩としては、例えば、ピルビン酸ナトリウム、ピルビン酸カリウム等が挙げられる。

ピルビン酸の濃度は、培地に対して0.01～0.5質量%が好ましく、菌の増殖及効率及び胞子嚢化率に優れるので、0.03～0.3質量%が特に好ましい。ピルビン酸は、殺菌前の培地成分に混合しても良いし、培地成分と分けて殺菌し、培養開始時に添加しても良い。

本発明の製造方法に用いる培地は、液体培地であっても固体培地であっても良い。また、本発明の製造方法を固体培地に適用する際に用いる基材としては、例えば、寒天等の多糖類が好ましく挙げられる。該基材の培地中の濃度は、0.5～5質量%が好ましく、菌の増殖促進効果に優れるので、1～3質量%が特に好ましい。

本発明の製造方法に適した培養温度は25～32℃である。また、本発明の製造方法に用いる培地のpHは、6.5～8.5が好ましく、7～8が特に好ましい。培地のpHを調整する方法は、各種の緩衝液、塩酸又は硫酸など通常用いられる酸、あるいは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム又はアンモニアなど通常用いられるアルカリを添加する方法が挙げられる。

液体培養は、回分培養、連続培養、半回分培養又は流加培養など、いずれの方法でも良い。培養時間は、培養方法、培養温度、培養pH及び接種菌体量によつ

て異なるが、通常、回分培養の場合で5～10日である。

培養終了後、培養物から胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢を回収する。その方法としては、固体培養の場合、培地の表面に該胞子嚢を含む菌体が存在するので、水あるいはリン酸緩衝液、Tris-HCl等の緩衝液を添加して5 懸濁させて該菌体を洗い出し、その後、遠心分離や濾過等の一般的な方法で分離回収する方法が挙げる。一方、液体培養の場合、培養液から遠心分離や濾過等の一般的な分離方法で該胞子嚢を含む菌体を分離し、回収する方法が挙げられる。後者の場合、必要に応じて、水や緩衝液を使った洗浄操作を加えても良い。

従来の培地を用いた培養方法では、コガネムシ科昆虫に防除効果を有する胞子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエの胞子嚢は殆ど得られず、下記式で表わされる胞子嚢化率（菌数あたりの胞子嚢数の割合）は、0.05%未満である。

(式1)

$$15 \quad \text{胞子嚢化率} (\%) = [(\text{胞子嚢数}) \div (\text{菌数})] \times 100$$

これに対し、本発明の製造方法によれば、胞子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢を胞子嚢化率5～50%という高い水準で製造することができる。また、液体培養により培養液1ml当たり、胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢の数を 5×10^7 以上、通常 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 個で製造することができる。

バチルス・ポピリエ (*Bacillus popilliae*) に属する菌株の中でも、コガネムシ科昆虫の幼虫に生育阻害若しくは殺虫活性を示す菌種としては、バチルス・ポピリエ・セマダラ (*Bacillus popilliae* Semadara, FERM BP-8068)、バチルス・ポピリエ・マメ (*Bacillus popilliae* var. *popilliae* Mame, FERM BP-8069)、バチルス・ポピリエ・ヒメ (*Bacillus popilliae* var. *popilliae* Hime, FERM P-17660)、バチルス・ポピリエ・サクラ (*Bacillus* p

opilliae var. popilliae Sakura, FERM
P-17662)、バチルス・ポピリエ・デュトキ (Bacillus popilliae Dutky, ATCC No. 14706)、バチルス・ポピリエ・メロロンサ (Bacillus popilliae subsp. melolonthae) 等が挙げられる。なお、バチルス・ポピリエ・セマダラ

5 は、平成10年5月21日に工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に受託番号 FERM P-1
6 6818で寄託され、平成14年6月10日にブタペスト条約に基づく国際寄託
10 に移管され、受託番号 FERM BP-8068が付与されている。また、バチ
15 ルス・ポピリエ・マメは、平成11年11月25日に工業技術院生命工学工業技
術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に受
託番号 FERM P-17661で寄託され、平成14年6月10日にブタペス
ト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号 FERM BP-8069が付与
されている。

15 本発明の製造方法により得られた胞子とパラスピラルボディとを含むバチル
ス・ポピリエに属する菌の胞子嚢は、コガネムシ科昆虫の幼虫に殺虫活性又は生
育抑制等の防除効果を示す。このため該胞子嚢はコガネムシ科昆虫の防除剤とし
て有用である。

20 防除対象のコガネムシ科昆虫は、ドウガネブイブイ (Anomala cup
rea)、セマダラコガネ (Blitopertha orientalis)、マメコガネ (Popillia japonica)、ウスチャコガネ
25 (Phyllopertha diversa)、チャイロコガネ (Adoretus tenuimaculatus)、ヒメコガネ (Anomala rufocuprea) 等が挙げられる。

25 本発明の製造方法により製造した胞子とパラスピラルボディとを含むバチル
ス・ポピリエに属する菌の胞子嚢は、それらを懸濁した液のまま昆虫、特にコガ
ネムシ科昆虫の防除剤として用いても良く、あるいは乾燥させて粉末にして散布
しても良い。また、乾燥させた後、水あるいは緩衝液の懸濁液として散布しても
良い。更に、該胞子嚢を、農薬に用いられる公知慣用の担体、固着剤、分散剤、

凍結防止剤、増粘剤又は栄養剤等の各種の添加剤と共に通常の微生物農薬の製造方法に従って、粉剤、粒剤、水和剤、乳剤、液剤、フロアブル又は塗布剤等に製剤化しても良い。また、本発明の製造方法により得られる胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢を他の微生物製剤に混合して使用することもできる。

5 前記防除剤に含まれる胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢の含有割合は、前記防除剤の形状と使用方法により異なるが、通常0.0001～100質量%が好ましい。

10 本発明の防除剤の施用方法としては、剤型や使用方法等または対象作物等によって適宜選択され、例えば、地上液剤散布、地上固形散布、空中液剤散布、空中固形散布、施設内施用、土壤混和施用又は土壤灌注施用等の方法を挙げられる。また、他の薬剤、すなわち殺虫剤、殺線虫剤、殺ダニ剤、除草剤、殺菌剤、植物生長調節剤、肥料又は土壤改良資材（泥炭、腐植酸資材又はポリビニルアルコール系資材等）等と混合して施用、あるいは混合せずに交互施用または同時施用することもできる。

15 前記防除剤の施用量は、コガネムシ科昆虫の種類、適用植物の種類及び剤型等によって異なるため一概には規定できないが、例えば、地上散布する場合、本発明の胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢の施用量は、 $10^{10} \sim 10^{15}$ 個／アールが好ましく、 $10^{11} \sim 10^{14}$ 個／アールが特に好ましい。

実施例

以下、実施例及び試験例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

25

（参考例1）

各実施例で調製した培地の培地成分として使用したペプトン、酵母エキス及びラクトアルブミン水解物中の遊離型アミノ酸含有量をオルトフタルアルデヒド（OPA）を用いたポストカラム法により測定した。

(1) 試料の調製

標準試料としてアミノ酸混合標準液H型（和光純薬社製、各アミノ酸2.5m
mol/lを含む）を0.02M塩酸で5倍希釈し、ポアサイズ0.2μmのフ
5 リルターで濾過し、標準試料溶液を調製した。

測定試料は、ペプトンとして「ポリペプトンS」（日本製薬社製）、「トリプ
トン」（ディフコ社製）のものを、酵母エキスとしてオクソイド社製、ディフコ
社製のものを、及びラクトアルブミン水解物（和光純薬社製）を用い、1.0質量%溶液を各々調製し、これらを10質量%トリクロロ酢酸水溶液で2倍希釈、
10 よく攪拌した後、遠心分離により不溶性沈殿を除去した。その後、上清をポアサ
イズ0.2μmのフィルターで濾過して各測定試料溶液を調製した。

(2) 分析

標準試料溶液、各測定試料溶液の10μlを高速液体クロマトグラフィーに注
15 入し、アミノ酸分析を行った。なお、分析は日立製作所製のアミノ酸自動分析装
置「La Chrom」を使用し、図2に示した流路図に基づいて行った。なお、
該アミノ分析に用いたOPA標識用反応液及び溶離液の組成を表1及び表2にそ
れぞれ記載した。

表 1

| O P A 標識用反応液の組成 | R 1 | R 2 | R 3 |
|---|---------|---------------|--------------|
| ホウ酸 | | 21.6 g | 21.6 g |
| 水酸化ナトリウム | 24.0 g | | |
| 25% Brij-35溶液 | | 4.0 ml | 4.0 ml |
| o-フタルアルテ ^ニ ヒト ^ニ / メタノール | | | 800mg / 10ml |
| 2-メルカブ ^ト エタノール | | | 2.0 ml |
| 5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 | | 150.0 μ l | |
| 水 | 残部 | 残部 | 残部 |
| 全量 | 1,000ml | 1,000ml | 1,000ml |

試薬は全て和光純薬社製特級品を使用した。

5 表 2

| 溶離液の組成 | A | B | C |
|---------------------------------|---------|---------|---------|
| クエン酸ナトリウム $2\text{H}_2\text{O}$ | 8.14 g | 26.67 g | |
| 塩化ナトリウム | 7.07 g | 54.35 g | |
| クエン酸 H_2O | 20.00 g | 6.10 g | |
| 水酸化ナトリウム | | | 8.0 g |
| エタノール | 110 ml | | |
| カプリル酸 | 0.1 ml | 0.1 ml | 0.1 ml |
| 水 | 残部 | 残部 | 残部 |
| 合計 | 1,000ml | 1,000ml | 1,000ml |

試薬は、全て和光純薬社製を使用し、クエン酸ナトリウム $2\text{H}_2\text{O}$ 、クエン酸 H_2O 及びカプリル酸はアミノ酸分析用、その他は特級品を使用した。

標準試料溶液及び各測定試料溶液より得られたピークエリヤから換算して、各測定試料中に含まれるL-グルタミン酸及び全アミノ酸の濃度を算出し、表3に

示した。

表3

| | ペプトン | | 酵母エキス | | ラクトアルブミン 水解物 |
|-------------------------|---------|-------|---------|----------|-----------------|
| | ホリペプトンS | トリプトン | オクソイト社製 | ティifik社製 | |
| グルタミン酸濃度 (質量%) | 0.70 | 1.27 | 7.74 | 7.48 | 2.56 |
| 全アミノ酸の 合計濃度 (質量%) | 17.88 | 21.65 | 36.67 | 31.45 | 27.37 |

5 (参考例2)

ハイネスら (Journal of Invertebrate pathology, 22巻, 377-381頁, 1973年) に記載の培地条件、即ち、
ペプトン0.5質量%、酵母エキス1.5質量%、リン酸水素二カリウム0.3
質量%、グルコース0.1質量%及び活性炭1質量%の組成に従い、市販されて
いる各ペプトン、酵母エキスを用いて考え得る組み合わせで調製した培地中のグ
ルタミン酸濃度、および全アミノ酸中に対するグルタミン酸の割合を計算し、表
4に示した。

表 4

| | ペプトンと その使用量 | 酵母エキスと その使用量 | 培地中のグルタミン酸 濃度 | 全アミノ酸に対する グルタミン酸の割合 |
|-------|-------------------|-------------------|------------------|------------------------|
| No. 1 | ポリペプトンS 0.5質量% | オクソイド社製 1.5質量% | 0.12質量% | 18.70質量% |
| No. 2 | ポリペプトンS 0.5質量% | ディフコ社製 1.5質量% | 0.12質量% | 20.62質量% |
| No. 3 | トリプトン 0.5質量% | オクソイド社製 1.5質量% | 0.12質量% | 18.57質量% |
| No. 4 | トリプトン 0.5質量% | ディフコ社製 1.5質量% | 0.12質量% | 20.44質量% |

培地中のグルタミン酸濃度は、市販の最もグルタミン酸含有率が高いペプトンと酵母エキスを用いた場合、すなわちディフコ社製「トリプトン」とオクソイド社製「酵母エキス」を用いた場合でも0.12質量%であった。

また、全アミノ酸に対するグルタミン酸の割合は、高いものでも20.62質量%であった。

(調製例 1)

- 10 蒸留水80gを入れたフラスコに、L-グルタミン酸(和光純薬社製特級)0.5g、吸着剤として活性炭素粉末(和光純薬社製特級)0.1g、ペプトン(日本製薬社製「ポリペプトンS」)0.5g、酵母エキス(オクソイド社製)0.5g、トレハロース二水和物(和光純薬社製特級)0.1g及び寒天(和光純薬社製特級)2.0gを加え混合した。さらに攪拌しながら1モル/リットルの水酸化カリウム水溶液を加えてpHを8.0に調整した。さらに蒸留水を加えて最終的に100gとし、培地(A-1)を調製した。

(調製例 2)

活性炭素粉末に代えて、三菱化学社製の商品名「DIAION HP20」

(吸着樹脂)を2.0g用いた以外は調製例1と同様にして、培地(A-2)を調製した。

(比較調製例1)

5 活性炭素粉末を加えなかった以外は調製例1と同様にして、培地(B-1)を調製した。

(比較調製例2)

調製例1において、L-グルタミン酸を加えなかった以外は、調製例1と同様
10 にして、培地(B-2)を調製した。

(比較調製例3)

調製例1において、活性炭素粉末に代えて、三菱化学社製の商品名「DIAI
ON HP20」(吸着樹脂)2.0gを用い、かつ、L-グルタミン酸を加え
15 なかった以外は、調製例1と同様にして、培地(B-3)を調製した。

(比較調製例4)

調製例1において、活性炭及びL-グルタミン酸を加えなかった以外は、調製
例1と同様にして、培地(B-4)を調製した。

表 5

| 培地名 | | A-1 | A-2 | B-1 | B-2 | B-3 | B-4 |
|------|------------|------|------|------|------|------|------|
| 培地成分 | L-グルタミン酸 | 0.5g | 0.5g | 0.5g | — | — | — |
| | 活性炭 | 0.1g | — | — | 0.1g | — | — |
| | 吸着樹脂 | — | 2.0g | — | — | 2.0g | — |
| | ペプトン | 0.5g | 0.5g | 0.5g | 0.5g | 0.5g | 0.5g |
| | 酵母エキス | 0.5g | 0.5g | 0.5g | 0.5g | 0.5g | 0.5g |
| | トレハロース二水和物 | 0.1g | 0.1g | 0.1g | 0.1g | 0.1g | 0.1g |
| | 寒天 | 2.0g | 2.0g | 2.0g | 2.0g | 2.0g | 2.0g |
| | 蒸留水 | 残部 | 残部 | 残部 | 残部 | 残部 | 残部 |
| 全量 | | 100g | 100g | 100g | 100g | 100g | 100g |

参考例 1 をもとに、培地中のグルタミン酸濃度及び全アミノ酸に対するグルタミン酸の割合をそれぞれ求め、結果を表 6 及び表 7 に記載した。

5

(実施例 1～2、比較例 1～4)

上記調製例 1～2 及び比較調製例 1～4 で得た各培地を 121℃、20 分間のオートクレーブで殺菌し、寒天が固化しないうちに十分攪拌して直径 9 cm のプラスチックシャーレに 20 ml ずつ分注して平板培地を作製した。

10 バチルス・ポピリエ・セマダラ及びバチルス・ポピリエ・サクラの種菌は、乳化病感染コガネムシ幼虫から採取した胞子嚢を用いた。胞子嚢数を顕微鏡による直接検鏡で計測し、蒸留水にて胞子嚢の濃度が 1×10^7 個/m l となるよう胞子嚢液を調製した。これらをプラスチックチューブに 0.5 ml 取り、ヒートブロックで 70℃、20 分間の加熱処理を行った。該種菌の $50 \mu l$ を上記で調製した平板培地に塗布し、30℃の培養装置内にて 8 日間培養した。

培養終了後、雑菌混入のなかつたシャーレを選抜し、該シャーレに蒸留水 2 ml を滴下して、発生したコロニーをよく懸濁し、菌体を回収した。胞子嚢数、及び菌数を顕微鏡による直接検鏡で計測し、胞子嚢化率を算出した。表 6 及び表 7

に各菌株のシャーレ1枚当たりの胞子囊数及び胞子囊化率を示した。

バチルス・ポピリエ・セマダラの培養

表6

| 培地名 | 液体培地中の グルタミン酸 (質量%) | 全アミノ酸に 対するグルタミン酸 の割合 (質量%) | 胞子囊数 (個/シャーレ) | 胞子囊化率 (%) |
|-----|---------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------|
| A-1 | 0.54 | 70.16 | 2.5×10^9 | 42 |
| A-2 | 0.54 | 70.16 | 1.0×10^9 | 37 |
| B-1 | 0.54 | 70.16 | 0 | 0 |
| B-2 | 0.04 | 15.47 | 5.0×10^8 | 13 |
| B-3 | 0.04 | 15.47 | 2.0×10^8 | 11 |
| B-4 | 0.04 | 15.47 | 0 | 0 |

5

バチルス・ポピリエ・サクラの培養

表7

| 培地名 | 液体培地中の グルタミン酸 (質量%) | 全アミノ酸に 対するグルタミン酸 の割合 (質量%) | 胞子囊数 (個/シャーレ) | 胞子囊化率 (%) |
|-----|---------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------|
| A-1 | 0.54 | 70.16 | 3.5×10^9 | 40 |
| A-2 | 0.54 | 70.16 | 2.0×10^9 | 25 |
| B-1 | 0.54 | 70.16 | 0 | 0 |
| B-2 | 0.04 | 15.47 | 1.0×10^8 | 18 |
| B-3 | 0.04 | 15.47 | 7.0×10^7 | 9 |
| B-4 | 0.04 | 15.47 | 0 | 0 |

表6及び表7の結果から、各菌株とも吸着剤及びグルタミン酸を添加した培地で培養した場合の方が胞子囊数及び胞子囊化率が高かった。

(調製例3)

5 蒸留水700gを入れたビーカーに、L-グルタミン酸(和光純薬社製特級)5g、ペプトン(日本製薬社製「ポリペプトンS」)5g、酵母エキス(オクソイド社製)5g及びトレハロース二水和物(和光純薬社製特級)5gを加え混合した。攪拌しながら濃度5モル/リットルの水酸化カリウム水溶液を添加してpHを7.6に調整した後、更に蒸留水を加えて最終的に850gとした。これを10 pH電極を備えた発酵槽(丸菱バイオエンジ社製)に移し、121℃、60分間のオートクレーブ殺菌を行った。

次に、フラスコに活性炭素粉末(和光純薬社製特級)3gを入れ、さらに蒸留水を加えて全量を100gとして活性炭分散液を調製した。また、別のフラスコに消泡剤(日本油脂社製「ディスホームCA-123」)1gを入れ、蒸留水を15 添加して全量を50gとし消泡剤液を調製した。活性炭分散液及び消泡剤液を殺菌し、その後、発酵槽に無菌的に加えて、培地(C-1)を調製した。

(比較調製例5)

調製例3において、活性炭素粉末を加えなかった以外は、調製例3と同様にして、培地(D-1)を調製した。

(比較調製例6)

調製例3において、L-グルタミン酸を加えなかった以外は、調製例3と同様にして、培地(D-2)を調製した。

25

(比較調製例7)

調製例3において、L-グルタミン酸に代えて、L-アラニン(和光純薬社製特級)5gを用いた以外は調製例3と同様にして、培地(D-3)を調製した。

表 8

| 培地名 | | C-1 | D-1 | D-2 | D-3 |
|------|------------|--------|--------|--------|--------|
| 培地成分 | L-グルタミン酸 | 5g | 5g | — | — |
| | L-アラニン | — | — | — | 5g |
| | 活性炭 | 3g | — | 3g | 3g |
| | ペプトン | 5g | 5g | 5g | 5g |
| | 酵母エキス | 5g | 5g | 5g | 5g |
| | トレハロース二水和物 | 5g | 5g | 5g | 5g |
| | 消泡剤 | 1g | 1g | 1g | 1g |
| | 蒸留水 | 残部 | 残部 | 残部 | 残部 |
| 全量 | | 1,000g | 1,000g | 1,000g | 1,000g |

(比較調製例 8)

「ハイネスら (Journal of Invertebrate pathology, 22巻, 1973年, 377-381頁)」と比較するため、蒸留水80gを入れたフラスコに、ペプトン(ディフコ社製「トリプトン」)0.5g、酵母エキス(オクソイド社製)1.5g、リン酸水素二カリウム(和光純薬社製特級)0.3g、グルコース(和光純薬社製特級)0.1g及び活性炭素粉末(和光純薬社製特級)1.0gを加え混合した。更に蒸留水を加えて最終的に100gとした。これをオートクレーブを用いて121℃、20分間殺菌し、培地(D-4)を調製した。

表 9

| 培地名 | | D-4 |
|------|------------|------|
| 培地成分 | 活性炭 | 1.0g |
| | トリプトン | 0.5g |
| | 酵母エキス | 1.5g |
| | グルコース | 0.1g |
| | リン酸水素二カリウム | 0.3g |
| | 蒸留水 | 残部 |
| 全量 | | 100g |

(実施例 3、比較例 5~8)

5 バチルス・ポピリエ・セマダラ、バチルス・ポピリエ・サクラ及びバチルス・
ポピリエ・マメの種菌として、各々予め活性炭を含む培地 (A-1) を用いた培
養で作製した胞子嚢を使用した。無菌的に回収した胞子嚢を顕微鏡による直接検
鏡で計測し、蒸留水にて胞子嚢の濃度が 1×10^9 個/m¹ となるように胞子嚢
液を調製した。

10 各菌株の胞子嚢液を 1 m¹ ずつプラスチックチューブに分注し、ヒートプロッ
クで 70℃、20 分間の加熱処理を行った。前記した発酵槽 (丸菱バイオエンジ
社製) 中で、培地 (C-1) 及び (D-1) ~ (D-3) には胞子嚢液を各 1 m¹ 接種し、発酵槽に備え付けられた攪拌翼を 150 rpm で回転させることによ
って、液体培地を攪拌しながら、通気 1 vvm、30℃、pH 7.6 制御の条件
で 7 日間培養した。一方、培地 (D-4) には胞子嚢液を 0.01 m¹ 接種し、
15 30℃ の培養装置内にて発酵槽に備え付けられた攪拌翼の回転数を 100 rpm
とした以外は、同様にして、7 日間培養した。

培養終了後、培養液中の単位体積当たりの胞子嚢数及び菌数を顕微鏡による直
接検鏡で計測し、胞子嚢化率を算出した。表 10 ~ 12 に培養液 1 m¹ あたりの
胞子嚢数と胞子嚢化率を示した。

バチルス・ポピリエ・セマダラの培養

表 10

| 培地名 | 液体培地中の グルタミン酸濃度 (質量%) | 全アミノ酸に 対するグルタミン酸 の割合 (質量%) | 胞子囊数 (個／ml) | 胞子囊化率 (%) |
|-------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------|
| C - 1 | 0.54 | 70.16 | 1.2×10^8 | 6.0 |
| D - 1 | 0.54 | 70.16 | 0 | 0 |
| D - 2 | 0.04 | 15.47 | 0 | 0 |
| D - 3 | 0.04 | 5.76 | 0 | 0 |
| D - 4 | 0.12 | 18.60 | 0 | 0 |

バチルス・ポピリエ・サクラの培養

5 表 11

| 培地名 | 液体培地中の グルタミン酸濃度 (質量%) | 全アミノ酸に 対するグルタミン酸 の割合 (質量%) | 胞子囊数 (個／ml) | 胞子囊化率 (%) |
|-------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------|
| C - 1 | 0.54 | 70.16 | 1.5×10^8 | 6.8 |
| D - 1 | 0.54 | 70.16 | 0 | 0 |
| D - 2 | 0.04 | 15.47 | 0 | 0 |
| D - 3 | 0.04 | 5.76 | 0 | 0 |
| D - 4 | 0.12 | 18.60 | 0 | 0 |

バチルス・ポピリエ・マメの培養

表 12

| 培地名 | 液体培地中の グルタミン酸濃度 (質量%) | 全アミノ酸に 対するグルタミン酸 の割合 (質量%) | 胞子囊数 (個/ml) | 胞子囊化率 (%) |
|-----|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------|
| C-1 | 0.54 | 70.16 | 1.6×10^8 | 7.2 |
| D-1 | 0.54 | 70.16 | 0 | 0 |
| D-2 | 0.04 | 15.47 | 0 | 0 |
| D-3 | 0.04 | 5.76 | 0 | 0 |
| D-4 | 0.12 | 18.60 | 0 | 0 |

表 10 ~ 12 の結果から、吸着剤とグルタミン酸とを添加した培地においての

5 み胞子囊が得られることが明らかである。

(調製例 4)

蒸留水 700 g を入れたビーカーに、L-グルタミン酸（和光純薬社製特級）
10 0.2 g、ペプトン（日本製薬社製「ポリペプトン S」）7.5 g、酵母エキス
（オクソイド社製）7.5 g、ラクトアルブミン水解物（和光純薬社製）5 g 及
びトレハロース二水和物（和光純薬社製特級）5 g を加え混合した。攪拌しなが
ら濃度 5 モル/リットルの水酸化カリウム水溶液を添加して pH を 7.6 に調整
した後、更に蒸留水を加えて 850 g とした。これを、pH 電極を備えた発酵槽
（丸菱バイオエンジ社製）に移し、オートクレーブを用いて、121°C、60 分
15 間殺菌を行った。

次に、フラスコに活性炭素粉末（和光純薬社製特級）3 g を入れ、蒸留水を加
えて 100 g として活性炭分散液を調製した。また、フラスコに消泡剤（日本油
脂社製「ディスホーム CA-123」）1 g を入れ、蒸留水を加えて 50 g とし
消泡剤液を調製した。該活性炭分散液及び消泡剤液を殺菌し、その後、各発酵槽
20 に無菌的に加え、培地（E-1）を調製した。

(調製例 5 ~ 8)

L-グルタミン酸の添加量を、それぞれ 0.5 g、0.8 g、1.5 g 及び 3.0 g とした以外は調製例 4 と同様にして、培地 (E-2) ~ (E-5) をそれぞれ調製した。

(比較調製例 9)

L-グルタミン酸を加えなかった以外は調製例 4 と同様にして、培地 (F-1) を調製した。

10

(比較調製例 10)

L-グルタミン酸の添加量を 5.0 g とした以外は調製例 4 と同様にして、培地 (F-2) を調製した。

15 表 13

| 培地名 | | F-1 | E-1 | E-2 | E-3 | E-4 | E-5 | F-2 |
|------|-------------|--------|------|------|------|------|------|------|
| 培地成分 | L-グルタミン酸 | — | 0.2g | 0.5g | 0.8g | 1.5g | 3.0g | 5.0g |
| | 活性炭 | 3g | 3g | 3g | 3g | 3g | 3g | 3g |
| | ペプトン | 7.5g | 7.5g | 7.5g | 7.5g | 7.5g | 7.5g | 7.5g |
| | 酵母エキス | 7.5g | 7.5g | 7.5g | 7.5g | 7.5g | 7.5g | 7.5g |
| | ラクトアルブシン水解物 | 5.0g | 5.0g | 5.0g | 5.0g | 5.0g | 5.0g | 5.0g |
| | トレハロース二水和物 | 5.0g | 5.0g | 5.0g | 5.0g | 5.0g | 5.0g | 5.0g |
| | 寒天 | 1g | 1g | 1g | 1g | 1g | 1g | 1g |
| | 蒸留水 | 残部 | 残部 | 残部 | 残部 | 残部 | 残部 | 残部 |
| 全量 | | 1,000g | | | | | | |

(実施例 4 ~ 8、比較例 9 ~ 10)

バチルス・ポピリエ・セマダラの種菌として、予め活性炭を含む培地 (A-)

1) を用いた培養で作製した胞子嚢を使用した。無菌的に回収した胞子嚢を顕微鏡による直接検鏡で計測し、蒸留水にて胞子嚢の濃度が 1×10^9 個／m¹ となるように胞子嚢液を調製した。

胞子嚢液を 1 m¹ ずつプラスチックチューブに分注し、ヒートブロックで 75 0°C、20 分間の加熱処理を行った。前記した発酵槽（丸菱バイオエンジ社製）中で、培地 (E-1) ~ (E-5) 及び (F-1) 乃至 (F-2) のそれぞれに胞子嚢液を各 1 m¹ 接種し、発酵槽に備え付けられた攪拌翼を 150 r p m で回転させることによって、液体培地を攪拌しながら、通気 1 v v m、30°C、pH 7.6 制御の条件で 7 日間培養した。

10 培養終了後、培養液中の単位体積当たりの胞子嚢数及び菌数を顕微鏡による直接検鏡で計測し、式 1 を用いて胞子嚢化率を算出した。表 1 4 に培養液 1 m¹ あたりの菌体数、胞子嚢数及び胞子嚢化率を示した。また、図 3 に培地に対するグルタミン酸濃度（質量%）と菌数（ $\times 10^8$ 個／m¹）及び胞子嚢数（ $\times 10^7$ 個／m¹）の関係を示した。

15

バチルス・ポピリエ・セマダラの培養

表 1 4

| 培地名 | 液体培地中の グルタミン酸濃度 (質量%) | 全アミノ酸に 対するグルタミン酸 の割合 (質量%) | 菌体数 (個／ml) | 胞子囊数 (個／ml) | 胞子囊化 率 (%) |
|-------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| F - 1 | 0.08 | 13.94 | 5.8×10^8 | 0 | 0 |
| E - 1 | 0.28 | 37.01 | 6.9×10^8 | 9.6×10^7 | 14.0 |
| E - 2 | 0.58 | 55.08 | 1.1×10^8 | 1.8×10^8 | 17.0 |
| E - 3 | 0.88 | 65.09 | 1.3×10^8 | 1.7×10^8 | 12.7 |
| E - 4 | 1.58 | 77.03 | 6.8×10^8 | 9.2×10^7 | 13.5 |
| E - 5 | 3.08 | 86.75 | 4.6×10^8 | 5.2×10^7 | 11.2 |
| F - 2 | 5.08 | 91.53 | 3.5×10^8 | 0 | 0 |

(調製例 9)

- 5 蒸留水 700 g を入れたビーカーに、L-グルタミン酸（和光純薬社製特級）5 g、ピルビン酸ナトリウム（和光純薬社製特級）1 g、ペプトン（日本製薬社製「ポリペプトンS」）7.5 g、酵母エキス（オクソイド社製）7.5 g、ラクトアルブミン水解物（和光純薬社製）5 g 及びトレハロース二水和物（和光純薬社製特級）5 g を加え混合した。続いて、攪拌しながら濃度4モル／リットルの水酸化ナトリウム水溶液を添加してpHを7.6に調整した後、更に蒸留水を加えて最終的に850 g とした。これをpH電極を備えた発酵槽（丸菱バイオエンジ社製）に入れて121℃、50分のオートクレーブ殺菌を行なった。
- 次に、フラスコに活性炭素粉末（和光純薬社製特級）2.5 g を入れ、さらに蒸留水を加えて100 g とし活性炭分散液を調製した。また、別のフラスコに消泡剤（日本油脂社製「ディスホームCA-123」）1 g を入れ、さらに蒸留水を加えて50 g とし消泡剤液を調製した。該活性炭分散液及び消泡剤液を殺菌し
- 10
- 15

た後、発酵槽に無菌的に加え、培地 (G-1) を調製した。

(調製例 10)

ピルビン酸ナトリウムの添加量を 2.5 g に変更した以外は調製例 9 と同様に
5 して、培地 (G-2) を調製した。

(比較調製例 11)

L-グルタミン酸を加えなかった以外は調製例 9 と同様にして、培地 (H-1) を調製した。

10

表 15

| 培地名 | | G-1 | G-2 | H-1 |
|------------------|-------------|--------|--------|--------|
| 培 地 成 分 | L-グルタミン酸 | 5g | 5g | — |
| | ピルビン酸ナトリウム | 1g | 2.5g | 1g |
| | 活性炭 | 2.5g | 2.5g | 2.5g |
| | ペプトン | 7.5g | 7.5g | 7.5g |
| | 酵母エキス | 7.5g | 7.5g | 7.5g |
| | ラクトアルブミン水解物 | 5g | 5g | 5g |
| | トレハロース二水和物 | 5g | 5g | 5g |
| | 消泡剤 | 1g | 1g | 1g |
| | 蒸留水 | 残部 | 残部 | 残部 |
| 全量 | | 1,000g | 1,000g | 1,000g |

(実施例 9 ~ 10、比較例 11)

実施例 6 と同様にしてバチルス・ポピリエ・セマダラを種菌として用い、前記
15 した発酵槽（丸菱バイオエンジ社製）中で、培地 (G-1) ~ (G-2) 及び培
地 (H-1) にそれぞれに胞子嚢液を各 1 ml ずつ無菌的に植菌して培養を開始
した。培養条件は温度 29°C、通気量 0.5 vvm、発酵槽に備え付けられた攪

拌翼の回転数を 150 rpm とし、培養中は濃度 4 モル／リットルの水酸化ナトリウム水溶液及び濃度 4 モル／リットルの硫酸にて pH 7.6 に制御した。

培養を 5 日間行い、培養液中の単位体積当たりの胞子囊数及び菌数を顕微鏡による直接検鏡で計測し、胞子囊化率を算出した。表 16 に培養液 1 ml あたりの

5 菌数、胞子囊数、胞子囊化率を示した。

表 16

| 培地名 | 液体培地中のグルタミン酸濃度 (質量%) | 全アミノ酸に対するグルタミン酸の割合 (質量%) | ピルビン酸濃度 (質量%) | 菌体数 (個／ml) | 胞子囊数 (個／ml) | 胞子囊化率 (%) |
|-----|-------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| G-1 | 0.58 | 55.08 | 0.08 | 1.5×10^8 | 2.5×10^8 | 16.7 |
| G-2 | 0.58 | 55.08 | 0.20 | 1.6×10^8 | 4.8×10^8 | 30.0 |
| H-1 | 0.08 | 15.47 | 0.08 | 1.0×10^8 | 0 | 0 |

表 16 に示した結果から、ピルビン酸ナトリウムを添加することによって、高い胞子囊化率となり、かつ得られた胞子囊数も多くなることが判る。

(生物試験例 1)

バチルス・ポピリエ・セマダラの胞子とパラスボラルボディとを含む胞子囊、胞子、パラスボラルボディによるコガネムシ科昆虫の幼虫の殺虫及び生育抑制効果試験を行った。

実施例 1 の培地 (A-1) を用いた培地で取得したバチルス・ポピリエ・セマダラの胞子囊を蒸留水に 2×10^8 個／ml となるよう懸濁させて懸濁液 (I) を調製した。さらに、実施例 1 の培地 (A-1) を用いた培地で取得したバチルス・ポピリエ・セマダラの胞子囊を含む懸濁液をフレンチプレス処理し、胞子囊から胞子とパラスボラルボディとを分離し取り出した。分離した胞子を蒸留水に 2×10^8 個／ml となるよう懸濁させ懸濁液 (II) を調製した。また、分離したパラスボラルボディを蒸留水に 2×10^8 個／ml となるよう懸濁させ懸濁液

(III) を調製した。

腐葉土を約 20 g ずつ入れた直径 6 cm のプラスチックカップを 80 個準備した。

- 5 (i) プラスチックカップ 20 個に対し、胞子囊数が 2×10^8 個／カップとなる
ように胞子囊を含む懸濁液 (I) を散布した。
- (ii) プラスチックカップ 20 個に対し、胞子数が 2×10^8 個／カップとなる
ように胞子のみを含む懸濁液 (II) を散布した。
- (iii) プラスチックカップ 20 個に対し、パラスボラルボディ数が 2×10^8 個
／カップとなるようにパラスボラルボディのみを含む懸濁液 (III) を散布した。
- 10 (iv) 残りの 20 個には何も散布せず、対照試験とした。

それぞれのカップにドウガネブイブイ 2 令幼虫を 1 頭ずつ入れ、25 °C の培養装置内で 30 日間飼育し、経時的に幼虫の死亡率と生存幼虫の平均体重の増加量を測定した。累積死亡率について表 17 に示し、生育抑制効果について図 4 に結果を示した。

15

表 17

| 試験区 | 累積死亡率 (%) | | |
|-------|-----------|------|------|
| | 11日目 | 23日目 | 30日目 |
| (i) | 20 | 40 | 45 |
| (ii) | 0 | 5 | 10 |
| (iii) | 15 | 20 | 25 |
| 対照 | 0 | 0 | 0 |

- 20 表 17 及び図 4 に示した結果から、胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子囊が優れた殺虫効果及び幼虫の生育抑制効果を有することが確認された。

(生物試験例 2)

本発明の製造方法（固体培養）により得られた胞子囊によるコガネムシ科昆虫

の殺虫試験を行った。

実施例 1 の活性炭含有平板培地 (A-1) を用いた培養で取得したバチルス・ポピリエ・セマダラの胞子嚢を蒸留水に 1×10^9 個/m¹ となるよう懸濁し胞子嚢液を調製した。直径 6 cm のプラスチックカップ 40 個に腐葉土を約 20 g ずつ入れ、そのうちの 20 個に対して、胞子嚢数が 1×10^9 個/カップとなるように胞子嚢液を散布した。残りの 20 個には胞子嚢液を散布せず、対照試験とした。それぞれのカップにドウガネブイブイ 2 令幼虫を 1 頭ずつ入れ、25°C の培養装置内で 40 日間飼育し、経時的に死亡個体数を調べ、累積死亡率 (%) を求め、その結果を表 18 に示した。

10

表 18

| 試験区 | 累積死亡率 (%) | | | |
|-------|-----------|-------|-------|-------|
| | 10 日目 | 20 日目 | 30 日目 | 40 日目 |
| 対照 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 胞子嚢添加 | 40 | 60 | 90 | 100 |

表 18 に示した結果から、本発明の胞子とパラスピラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢を散布した試験区では、40 日目に 100% の 15 死亡率が観察された。

(生物試験例 3)

本発明の製造方法 (液体培養) により得られた胞子嚢によるコガネムシ科昆虫の殺虫試験を行った。

20 生物試験例 2 と同様にして試験区を作製した。ただし、散布した胞子嚢は、

- (i) 実施例 3 の活性炭含有液体培地 (C-1) を用いた培養で取得したバチルス・ポピリエ・セマダラの胞子嚢、
- (ii) 実施 3 の活性炭含有液体培地 (C-1) を用いた培養で取得したバチルス・ポピリエ・マメの胞子嚢、

25 であった。それぞれのカップにドウガネブイブイ 2 令幼虫を 1 頭ずつ入れ、2

5 °Cの培養装置内で40日間飼育し、経時的に死亡個体数を調べ、累積死亡率(%)を求めた。表19に本発明の液体培養で得られた胞子嚢のドウガネブイブイに対する殺虫活性を示した。

5 表19

| 試験区 | 累積死亡率(%) | | | |
|------|----------|------|------|------|
| | 10日目 | 20日目 | 30日目 | 40日目 |
| 対照 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (i) | 15 | 30 | 95 | 100 |
| (ii) | 10 | 35 | 65 | 85 |

表19に示した結果から、本発明の胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢を散布した試験区では、40日目に85~100%の死亡率が観察された。

10

(生物試験例4)

本発明の製造方法(液体培養)により得られた胞子嚢によるコガネムシ科昆虫の殺虫試験を行った。実施例10に示した培地(G-2)の培養により得たバチルス・ポピリエ・セマダラ株の胞子嚢を蒸留水に 1×10^9 個/m¹となるよう15 懸濁し胞子嚢液を調製した。

直径6cmのプラスチックカップ40個に腐葉土20gずつを入れた。そのうちの20個に対して、胞子嚢数が 1×10^9 個/カップとなるよう胞子嚢液を散布した。残りの20個には胞子嚢液を散布せず、対照試験とした。それぞれのカップにドウガネブイブイ2令幼虫を1頭ずつ入れ、25°Cの培養装置内で20日間飼育し、経時的に死亡個体数を調べ、累積死亡率(%)を求め、その結果を表20に示した。

表 20

| 試験区 | 累積死亡率 (%) | | | |
|-------|-----------|------|------|------|
| | 10日目 | 20日目 | 30日目 | 40日目 |
| 対照 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 胞子嚢添加 | 15 | 30 | 95 | 100 |

表 20 に示した結果から、本発明の胞子とパラスピラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢を散布した試験区では、40日目に 100% の
5 死亡率が観察された。

What is claimed is:

1. 吸着剤を含む培地でバチルス・ポピリエに属する菌を培養して、胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子囊を製造する方法において、前記培地が 0.2~4.0 質量% のグルタミン酸を含むことを特徴とする胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子囊の製造方法。

5 2. 前記培地中に含まれる全アミノ酸に対するグルタミン酸の割合が 3.5~9.0 質量% の範囲にある請求項 1 に記載のバチルス・ポピリエに属する菌の胞子囊の製造方法。

10 3. 前記培地がさらにピルビン酸を含む請求項 1 に記載のバチルス・ポピリエに属する菌の胞子囊の製造方法。

15 4. 前記培地中のピルビン酸の割合が 0.01~0.5 質量% の範囲にある請求項 3 記載のバチルス・ポピリエに属する菌の胞子囊の製造方法。

20 5. 請求項 1 に記載の製造方法により得られた胞子とパラスボラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の胞子囊を有効成分として含有するコガネムシ科昆虫の防除剤。

6. 請求項 5 に記載の防除剤をコガネムシ科昆虫の生息土壤に散布するコガネムシ科昆虫の防除方法。

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

コガネムシ科昆虫に対し防除効果を有するバチルス・ポピリエの胞子とパラス
ポラルボディとを含む胞子嚢を効率良く得る製造方法、該製造方法により得られ
5 るコガネムシ科昆虫の防除剤及び防除方法を提供する。吸着剤を含む培地でバチ
ルス・ポピリエに属する菌を培養して、胞子とパラスポラルボディとを含むバチ
ルス・ポピリエに属する菌の胞子嚢を製造する方法において、前記培地が0.2
～4.0質量%のグルタミン酸を含む。